



Compte-rendu du débat INERIS – Société civile

Les méthodes d'évaluation de l'écotoxicité et de la toxicité des nanoparticules

18 octobre 2016

Sommaire

Liste des participants	3
Contexte	4
Les compétences de l'INERIS.....	4
Points clés de la présentation	5
Etat des lieux et perspectives concernant les méthodes d'évaluation de la toxicité des nanoparticules.....	5
Etat des lieux et perspectives concernant les méthodes d'évaluation de l'écotoxicité des nanoparticules.....	6
Eléments de discussion	8
Document.....	9
INERIS en bref	10
Contacts INERIS	10

Liste des participants

Participants

Prénom	Nom	Organisme
Philippe	BOURLITIO	Avicenn
Simone	CASSETTE	CNANOS
Bérangère	COLLAS	COLAS
Francis	GLEMET	CNMSE (CORE)
Jennifer	OSES	ATC
Vincent	PERROT	CLCV (CORE)
André	PICOT	ATC
Daniel	VIGIER	FNE

Excusés : Mathilde Etcheverry, Gérald Hayotte, Sylvaine Ronga-Pezeret

INERIS

Prénom	Nom	Organisme
Céline	BOUDET	INERIS, responsable ouverture à la société
Anne	BRAUN	INERIS, responsable unité toxicologie expérimentale
Raymond	COINTE	INERIS, directeur général
Mehdi	GHOUREYCHI	INERIS, directeur scientifique
Philippe	HUBERT	INERIS, directeur des risques chroniques
Nicolas	MANIER	INERIS, ingénieur unité écotoxicologie
Eric	THYBAUD	INERIS, responsable pôle toxicologie écotoxicologie

Contexte

Les nanomatériaux sont présents dans de nombreux domaines d'application et produits de la vie quotidienne. La toxicité chez l'homme des nanoparticules, lorsqu'elles sont ingérées ou inhalées, demeure mal connue. De nombreuses questions subsistent également concernant leur impact sur l'environnement. Les propriétés dangereuses des nanomatériaux sont variées : (éco-)toxicité directe, induite ou oxy-réactivité (explosion, inflammabilité...). Leurs risques potentiels, chroniques comme accidentels, sont liés aux propriétés spécifiques qui caractérisent les échelles nanométriques¹. Le défi consiste donc à évaluer ces risques potentiels durant tout le cycle de vie des nanomatériaux : de leur production et intégration dans les produits jusqu'à la fin de vie, en passant par l'usage. L'enjeu préalable est la définition précise et partagée de ce qui doit être mesuré : la réglementation et la normalisation sont des leviers importants pour homogénéiser les modalités de caractérisation physico-chimique des nanomatériaux.

Au niveau européen, les dossiers d'enregistrement REACH susceptibles de concerner des nanomatériaux font apparaître de manière imparfaite les caractéristiques propres aux formes nanoparticulaires des substances. Ceci conduit à un déficit dans l'information tant des utilisateurs que des consommateurs ou du grand public. La Commission Européenne estime que REACH reste le meilleur cadre possible pour la gestion des risques liés aux nanomatériaux mis sur le marché, à condition que les annexes du règlement soient adaptées. Afin d'explicitier les informations requises pour les nanomatériaux, leur révision est donc en cours.

Les compétences de l'INERIS

L'Institut dispose de compétences en caractérisation des dangers (éco-) toxicologiques et physico-chimiques, métrologie, sécurité des procédés, évaluation des expositions, analyse des risques chroniques et accidentels. Ces compétences sont enrichies par des programmes de recherche nationaux et européens puis mises en œuvre dans des missions d'appui (technique, réglementaire), d'expertise (publique ou privée), de formation et de certification. De plus, l'INERIS s'est doté d'une plate-forme nano-sécurisée pour renforcer l'expertise et la recherche sur les risques liés aux nanotechnologies. L'Institut a été retenu pour le pilotage du développement de nouveaux protocoles pour l'inflammation et l'explosivité des nanomatériaux dans le cadre du CEN/TC 352. Il fait aussi partie du groupe d'experts de l'OCDE en charge de stabiliser des documents de référence sur la problématique des nanomatériaux et de définir les outils, moyens d'essais et modes opératoires devant être mis en œuvre pour leur gestion (stockage, valorisation, recyclage).

¹ Les substances à l'état nanoparticulaire ont des dimensions comprises entre 1 et 100 nanomètres.

Points clés de la présentation

Après une introduction générale d'Eric Thybaud sur les propriétés des nanoparticules et l'avancée de REACH sur la question (les nanoparticules étant intégrées dans le règlement européen, la charge de la preuve et les responsabilités sont portées par les industriels), Anne Braun et Nicolas Manier présentent respectivement l'état des lieux et les perspectives concernant les méthodes d'évaluation de la toxicité et de l'écotoxicité des nanoparticules.

Etat des lieux et perspectives concernant les méthodes d'évaluation de la toxicité des nanoparticules

L'INERIS développe des méthodes pour évaluer la toxicité des substances chimiques et des nanomatériaux par voie respiratoire. A l'heure actuelle, l'expérimentation animale reste le moyen le plus fiable pour évaluer la toxicité d'un nanomatériau inhalable. Toutefois, les exigences éthiques (règle des « 3R »²) ainsi que la diversité extrême des nanomatériaux nécessitent de rechercher des méthodes alternatives aux expérimentations *in vivo*, telles que des méthodes *in vitro*. L'enjeu est alors de développer des conditions expérimentales qui miment au mieux la réalité des expositions. Ainsi, des modèles cellulaires (co-cultures, cultures 3D) et des méthodes d'exposition (interface air-liquide) sophistiqués ont été développés. Néanmoins, il reste encore à déterminer si évaluer la toxicité *in vitro* d'un nanomatériau en simulant les conditions d'exposition *in vivo* donne des résultats fiables et prédictifs. Les résultats préliminaires des travaux de recherche en cours sur cette question à l'INERIS sont présentés et illustrés par des exemples portant sur des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂), dont la France participe à l'évaluation dans le cadre du plan d'action communautaire pour l'évaluation des substances du règlement REACH. Les conclusions et perspectives sont rappelées sur les 3 figures suivantes.

Conclusions de nos études

- L'approche *in vivo* : méthode la plus sensible et exhaustive pour évaluer la toxicité (pulmonaire) des nanoparticules
- Les modèles cellulaires complexes et la méthode d'exposition à l'interface air-liquide testés, présentent une sensibilité plus forte et plus proche de l'*in vivo* (ex: de niveaux d'activation de l'inflammation).
- La comparaison *in vitro/vivo* a montré que les approches *in vitro* ont fourni des informations fiables sur le classement relatif de la toxicité (inflammation) des nanoparticules de TiO₂ testées obtenues *in vivo*

Qu'en est-il pour d'autres nanoparticules, d'autres paramètres de toxicité que l'inflammation, d'autres voies d'exposition?

INERIS
Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
Présentation INERIS - 19/12/2016 16

² Remplacer, Réduire, Raffiner (les protocoles ayant recours aux animaux)

Conclusion générale et Perspectives



IN VITRO AIR- LIQUIDE
Etudes court terme

- ⇒ Interface physiologique
- ⇒ Moins d'interactions artificielles des nanoparticules avec des milieux d'essai
- ⇒ Criblage d'effets moyen débit;
- ⇒ Etudes de mécanismes/passage

Des méthodologies Complémentaires (3R)



IN VIVO INHALATION
Etudes long terme

- ⇒ Bas débit
- ⇒ Impact toxicologique sur l'organisme entier et tous les organes (histologie)
- ⇒ Conséquences pathologiques des effets précoces
- ⇒ Modèles animaux vulnérables (asthme...)

Avec des besoins communs/standardisables

- Métriologie et détermination des doses
- Caractérisation et analyses physico-chimiques
- Systèmes de génération des aérosols de nanoparticules

Présentation INERIS - 15/12/2010 17



Conclusion générale et Perspectives

- Proposer des méthodologies standardisées (in vivo et in vitro) à la communauté scientifique, aux industriels et aux instances réglementaires (ex: choix de la métrique de dose)
- Proposer des stratégies de « criblage » haut débit, pour essayer de grouper les nanoparticules en « familles »
- Proposer des paramètres de toxicité in vitro prédictifs:
=> Approche en amont de « safer by design »
- Evaluer la toxicité des nanoparticules tout au long de leur cycle de vie

Présentation INERIS - 15/12/2010 18



Etat des lieux et perspectives concernant les méthodes d'évaluation de l'écotoxicité des nanoparticules

S'agissant des méthodes d'évaluation de l'écotoxicité, l'exposé portera davantage sur l'application des protocoles d'essai existants (*i.e.* ligne directrice OCDE, normes ISO) à la problématique posée par les nanoparticules. Il est ici rappelé que les axes de travail de l'INERIS au sein de cette thématique focalisent sur la caractérisation de l'écotoxicité vis-à-vis des micro-crustacés et des micro-algues d'eau douce. L'Institut conduit des études sur l'influence des méthodologies d'essai, en lien avec les modes de préparation et la stabilité des suspensions pour les essais aquatiques. Ainsi, les résultats des travaux

publiés fin 2015 sur l'évaluation des effets de nanoparticules de TiO₂ sur la croissance d'algues vertes unicellulaires utilisant l'essai OCDE 201, et les trois systèmes d'exposition recommandés, sont expliqués et illustrés. Ils démontrent là encore la nécessité d'adapter les essais existants aux caractéristiques physico-chimiques spécifiques des nanoparticules. Les principaux besoins et perspectives sont rappelés sur les 2 figures suivantes.

Résumé des principaux besoins

- Protocoles de mise en suspension des nanoparticules pour les études aquatiques
 - quelles techniques utiliser ?
 - adéquation technique / type de nanoparticule ?
- Quels milieux acceptables pour les essais ?
 - un seul et même milieu ?
 - plusieurs milieux de compositions différentes ? (dureté ; pH)
- Identifier les limites des protocoles d'exposition des organismes; disposer de protocoles adaptés et harmonisés ;
- Prise en compte de l'interaction physique avec les organismes ;
- Choix de la métrique pour l'expression des résultats (masse; surface spécifique; nombre de particules ?).

Présentation NERS – 15/10/2014 32



Perspectives et travaux futurs

- Prise en compte de l'interaction entre les nanoparticules et les organismes
 - Développement d'un test de contact « algues-nano » pour le screening de l'écotoxicité a priori des nanoparticules ;
- Etudes de l'écotoxicité des nanoparticules émises des produits et/ou articles en conditions d'usage (prise en compte des modifications physico-chimiques)
 - Depuis 2015 études du relargage et de l'écotoxicité de nanoparticules de cérium présentes dans des lasures pour la protection du bois.

Présentation NERS – 15/10/2014 33



Eléments de discussion

S'agissant de la toxicologie respiratoire, l'INERIS insiste sur le fait qu'il n'y a pas de répartition homogène des nanoparticules dans les poumons : c'est physiologique. La métrique utilisée est donc très importante pour calculer la quantité de nanoparticules au niveau du poumon. Cette répartition n'est pas à interpréter en termes d'effet sur la santé.

L'INERIS précise que l'effet étudié ici est l'inflammation à court terme via un marqueur d'effet biologique précoce qui est la sécrétion de cytokines. L'inflammation peut ne pas être pathologique à long terme et l'observation d'un effet biologique précoce ne signifie pas nécessairement un effet néfaste pour la santé.

Les participants constatent que le nombre de nanoparticules est tel qu'il semblerait opportun, dans une logique de proposition de méthodes standardisées *in vitro* et *in vivo* et de reproductibilité et de répétabilité des paramètres prédictifs de leur toxicité, d'adopter une stratégie de criblage haut débit pour les grouper par grande famille. Les participants insistent par ailleurs sur l'importance d'étudier la toxicité des nanoparticules tout au long de leur cycle de vie, en particulier une fois que la substance à l'état nanoparticulaire est intégrée dans un produit de consommation courant (crème, peinture...).

L'Institut a concentré ses études sur la toxicité pulmonaire et donc sur les nanoparticules en poudre, mais des études sont aussi lancées sur des produits contenant ces substances et sur leur fin de vie. Le souci premier étant que les outils sont aussi en cours d'adaptation voire de développement et que l'on coure donc après les connaissances, sans comprendre encore totalement ce que peuvent traduire/prédire lesdits outils. La priorité reste donc de développer des méthodes robustes. La bibliographie est très fournie mais les résultats sont variables selon les protocoles utilisés, les nanoparticules et les effets étudiés. Si on considère au départ que les nanoparticules n'auront pas toutes le même effet, il convient pour des raisons de faisabilité de segmenter le problème pour trouver un minimum d'outils qui soit applicable à l'ensemble des nanoparticules.

Certains participants proposent une autre façon de prioriser les nanoparticules à évaluer qui serait de construire des programmes avec les industriels qui les fabriquent, et de cibler les nanoparticules fabriquées en grande quantité, sans aller les chercher au niveau des produits.

L'Institut précise que les nanoparticules testées pour élaborer les méthodes d'évaluation sont celles qui sont prioritaires dans le programme de l'OCDE (titane et sésium). Les outils développés doivent s'intégrer dans des approches AOP (Adverse Outcome Pathway : par chemin de l'effet néfaste) : elles permettent de répondre à l'enjeu de passer d'une observation d'un effet biologique à la possibilité d'une pathologie.

S'agissant de l'écotoxicité, l'INERIS précise que les mêmes souches de daphnies ont été utilisées pour les exemples présentés mais l'Institut travaille aussi sur d'autres souches de daphnies. On utilise également des milieux témoins. On vérifie les données historiques. Même sur une même souche, un même clone, sur le même test, on peut obtenir des résultats différents : les différences de sensibilité sont très importantes. Il est donc indispensable de très bien décrire la nanoparticule utilisée et l'essai conduit.

Au vu de cette variabilité, comme pour la toxicité, le meilleur objectif à se fixer serait de définir une gamme de paramètres prédictifs de l'écotoxicité, sur la base d'un minimum d'outils applicables au plus grand nombre de nanoparticules.

La métrique utilisée est là aussi fondamentale, la surface spécifique semble être un bon paramètre sur la base des travaux présentés par l'Institut. Des travaux sont en cours à l'OCDE afin d'intégrer ces résultats.

L'Institut se pose la question de la pertinence d'étudier l'écotoxicité des nanoparticules dans l'eau, sachant qu'elles ne sont pas solubles : elles s'agglomèrent. La question des sédiments pourrait être davantage problématique, pour toute la chaîne trophique.

Les participants soulèvent le fait que l'usage des substances à l'état nanoparticulaire est souvent justifié par le fait qu'on en met moins en quantité que la substance classique. Mais la dose efficace est plus réactive, donc potentiellement plus toxique. Par exemple, on utilise le cuivre à l'état nanoparticulaire pour l'agriculture biologique en France : il est moins toxique pour les vers de terre mais devient inhalable. L'exemple du sous-nitrate de bismuth utilisé micronisé est aussi cité par la salle ; cela a créé l'apparition d'encéphalopathies car il passait la barrière du nerf olfactif.

Par ailleurs, la salle relève que la mise sur le marché correspond à un usage donné mais rien n'empêche l'utilisateur d'en faire autre chose. Sait-on exactement ce qui est vendu et pourquoi ? L'Institut précise que le producteur reste responsable de toute la chaîne de valeur, y compris les utilisations aval de son produit. Mais la connaissance de cette utilisation aval et la traçabilité des produits importés sont des limites du registre national R-nano.

Document

Fiche ONG transmise par e-mail avant la réunion : Les méthodes d'évaluation de l'écotoxicité et de la toxicité des nanoparticules : <http://www.ineris.fr/centredoc/fiche-nano-v5-1476177601.pdf>

INERIS en bref

Domaines d'expertise de l'INERIS :

RISQUES CHRONIQUES

Évaluation de la toxicité et de l'écotoxicité des substances chimiques. Modélisation et surveillance des atteintes à l'homme et à l'environnement générées par les pollutions, les champs électromagnétiques et dues aux installations et aux activités humaines. Réduction de la pollution des milieux ambiants et sols pollués.

RISQUES ACCIDENTELS

Évaluation des risques (incendie, explosion, rejets toxiques, foudre...) liés aux installations industrielles, aux procédés, aux produits, ainsi qu'aux infrastructures et systèmes de transports (tunnels, ports...). Maîtrise des risques par les dispositions technologiques et organisationnelles. Appui technique dans la mise en œuvre des Plans de Prévention des Risques Technologiques (PPRT).

RISQUES DU SOL ET DU SOUS-SOL

Évaluation et prévention des risques de mouvement de terrain liés aux anciennes exploitations (mines ou carrières), aux stockages souterrains ou à certains sites naturels (versants rocheux, talus, falaises...). Surveillance et auscultation des massifs rocheux ou des ouvrages. Évaluation des risques liés aux eaux souterraines et aux émanations gazeuses du sol.

SÉCURITÉ DES ÉQUIPEMENTS ET DES PRODUITS

Connaissance et classification des produits énergétiques et autres produits dangereux. Fiabilité des dispositifs technologiques de sécurité. Évaluation de la conformité réglementaire et normative des systèmes, matériels et produits dont les produits explosifs et pyrotechniques.

CONSEIL EN MANAGEMENT DES RISQUES

Conseil et accompagnement dans la mise en place de systèmes de management Hygiène, Santé, Sécurité, Environnement (HSSE). Aide à l'intégration des systèmes de management QHSE. Développement d'outils de diagnostic et analyse des causes humaines et organisationnelles après un accident. Suivi et diagnostic réglementaires.

Portail INERIS : www.ineris.fr

Contact INERIS

Céline Boudet, Responsable ouverture et dialogue avec la société
celine.boudet@ineris.fr / 03 44 55 65 95